



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사 학위논문

혈관 내피 세포와 정상 간뇌 세포에의
독성에 기반한 기호식품 화학성분의
방사선 동등성 연구

A study on radiation-equivalency of chemical
extracts from favorite foods in terms of
cytotoxicity on mouse endothelial cell and
normal diencephalon cell.

2013 년 8 월

서 울 대 학 교 대학원
에너지시스템공학부
이 승 희

혈관 내피 세포와 정상 간뇌 세포에의
독성에 기반한 기호식품 화학성분의
방사선 동등성 연구

지도 교수 김 은 희

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함
2013 년 8 월

서울대학교 대학원
에너지시스템공학부
이 승 희

이승희의 공학석사 학위论문을 인준함
2013 년 8 월

위 원 장 김 곤 호 (인)

부위원장 김 은 희 (인)

위 원 심 형 진 (인)

초 록

방사선의 인체 영향에 대한 연구는 방사선량, 방사선의 종류, 피폭 장기(organ) 등에 따라 다양하게 진행되어 왔다. 그러나 대중들에게 이와 관련한 방사선 위해 정보들이 지속적으로 제공됨에도 불구하고 방사선 이해도가 매우 낮으며, 이러한 부정확한 인식은 방사선에 대한 과장된 공포와 불안을 조성할 우려가 있다. 따라서 본 연구는 기존의 정보 형태에서 벗어나 일반인들이 이해하기 쉬운 새로운 형태의 자료 제시를 목적으로 한다.

본 연구는 대표적 기호식품인 술, 담배, 커피의 핵심 구성 화학물질인 에탄올, 니코틴, 카페인을 대상으로 방사선 피폭과 동등한 위해성을 보이는 화학물질의 농도를 도출하였다. 타 연구에서 in vitro 상 세포 실험을 통해 방사선의 세포 손상 기전이 에탄올, 니코틴, 카페인에 의한 세포 손상의 기전과 유사함을 보여 준 바 있으므로 방사선과 이들 화학물질의 세포 손상 정도에 대한 정량적 비교가 가능하다고 판단하였다. 세포 독성(Cytotoxicity) 측정을 위한 생물학적 검정(Biological assay)은 apoptosis assay, clonogenic assay 를 통해 측정되었으며 세포는 Mouse endothelial cell, Normal diencephalon cell 을 사용하였다.

In vitro 실험 결과, 본 연구는 기호식품 내 화학물질의 방사선 동등성을 확인하고 상관관계를 도출하였으며, 1Gy 방사선 피폭 준위와

동일한 생물학적 세포독성을 발생시키는 기호식품의 화학물질 농도를 구하였다. 따라서 본 연구를 통해 제시된 결과는 위해 기호식품 섭취 농도를 통해 방사선의 인체 피해 정도를 알릴 수 있으므로 일반인들의 방사선 위해 정보에 대한 효과적인 이해 증진에 기여할 것이라 예상된다.

주 요 어: 기호식품, 세포독성, 방사선 위해, 방사선 동등성

학 번: 2011-23424

목 차

초 록.....	i
목 차.....	iii
그림목차.....	v
표 목 차.....	vii
제 1 장 서 론.....	1
1.1 연구의 목적	1
1.2 연구의 범위	2
제 2 장 배경이론.....	4
2.1 Radiological cell damage.....	4
2.2 Chemical cell damage.....	6
2.2.1 Ethanol	6
2.2.2 Nicotine	9
2.2.3 Caffeine	10
2.3 Apoptosis	12
2.4 Survival curve / Linear quadratic model	15

제 3 장 대상 및 방법	17
3.1 Cell and Cell culture	17
3.2 Irradiation	18
3.3 Chemical treatments	19
3.3.1 Ethanol	19
3.3.2 Nicotine	20
3.3.3 Caffeine	21
3.4 Apoptosis analysis	23
3.5 Clonogenic assay	24
3.6 Statistical Analysis	25
 제 4 장 결과 및 분석	 26
4.1 Dose-dependent apoptotic cell death.	27
4.2 Dose -response analysis of apoptotic cell death	32
4.3 Dose -response analysis of clonogenic cell survival	38
4.4 Calculation of radiation-equivalency of chemical.....	43
제 5 장 결론	46
참고문헌	48
ABSTRACT	54
감사의 글	

그림목차

Fig. 2.1 Direct and Indirect actions of radiation in cell	5
Fig. 2.2 Diagram illustrating the generation of different DNA-damaging agents as a result of chronic ethanol ingestion, and the different types of DNA damage produced. ADH, alcohol dehydrogenase; LPPs, lipid peroxidation products; MDA, malondialdehyde; HNE, 4-hydroxynonenal; $N^2 - Et - dG, N^2 - Ethyl - 2' - deoxyguanosine$	8
Fig. 2.3 Diagram to illustrate the morphological features of apoptosis.....	14
Fig. 4.1 Percent apoptosis of Mouse endothelial cells observed after exposure to (A) ethanol, (B)nicotine and (C) caffeine for 24hours in incubator. MECs were incubated for 24 hours after irradiation (D). The error bars indicate one standard deviation.	29
Fig.4.2 Percent apoptosis of Mouse endothelial cells observed after exposure to ethanol for 24 hours. The data of ethanol-1096mM was added for inferring tendency of dose-dependent apoptosis.	30
Fig.4.3 Percent apoptosis of Normal Diencephalon Cells observed after exposure to (A)ethanol, (B)nicotine and (C)caffeine for 24hours in incubator. Normal Diencephalon Cells were incubated for 24 hours after irradiation (D). The error bars indicate one standard deviation.	31

Fig.4.4	Percent apoptosis of Mouse endothelial cells observed after exposure to (A)ethanol, (B)nicotine and (C)caffeine for 24hours in incubator(dots). Mouse endothelial cells were irradiated and incubated for 24hours(D). The solid lines are the second order polynomial curves (linear-quadratic model) fitting experimental data points.	
	The error bars indicate one standard deviation.	34
Fig.4.5	Percent apoptosis of Normal Diencephalon Cells observed after exposure to(A)ethanol, (B)nicotine and (C)caffeine for 24hours in incubator(dots).Normal Diencephalon Cells were irradiated and incubated for 24hours.(D)The solid lines are the second order polynomial curves(linear-quadratic model) fitting experimental data points.	
	The error bars indicate one standard deviation.	35
Fig.4.6	Clonogenic surviving fractions of Mouse endothelial cells observed after 24h exposure to (A)ethanol,(B)nicotine, (C)caffeine and (D)radiation (dots). The lines are the linear-quadratic curves fitting experimental data.	
	The error bars indicate one standard deviation.	40
Fig.4.7	Clonogenic surviving fractions of Normal Diencephalon Cells observed after 24h exposure to (A)ethanol, (B)nicotine, caffeine and (D)radiation (dots). The lines are the linear-quadratic curves fitting experimental data.	
	The error bars indicate one standard deviation.	41
Fig.4.8	Calculation of radiation-equivalency of ethanol, nicotine, caffeine inducing same percent apoptosis(A,B) and surviving fraction(C, D)	45

표 목 차

Table 3.1 Ethanol treatment doses and time.	19
Table 3.2 Nicotine treatment doses and time.	20
Table 3.3 Caffeine treatment doses and time.	21
Table 3.4 Chemical treatment doses with molarity.....	22
Table 4.1 Coefficients of linear-quadratic curves for percent apoptosis of Mouse endothelial cells	36
Table 4.2 Coefficients of linear-quadratic curves for percent apoptosis of Normal Diencephalon Cells.....	36
Table 4.3 Chemical doses equivalent to 1 Gy of radiation dose in apoptotic cytotoxicity with Mouse endothelial cells and Normal Diencephalon Cells in vitro.	37
Table 4.4 Chemical doses equivalent to 1 Gy of radiation dose in surviving fraction with Mouse endothelial cells and Normal Diencephalon Cells in vitro.	42

제 1 장 서 론

1.1 연구의 목적

본 연구의 핵심은 방사선의 인체 영향에 대한 정보를 일반인들이 이해하기 쉬운 형태로 제공하는 것이다. 현재까지 방사선의 인체 위해도에 대한 다양한 정보가 제공됨에도 불구하고 대중에 의한 효과적인 이해가 매우 낮으며 이러한 부정확한 인식은 방사선에 대한 과도한 공포와 불안을 조성할 우려가 있다. 따라서 기존에 방사선의 인체 위해도에 대한 정보를 제시하는 방법에서 벗어나 일반인들이 이해하기 쉬운 새로운 형태의 자료 생산을 목적으로 한다.

일반적으로 국민이 받는 방사선 피폭 선량은 자연방사선에 의한 피폭으로 평균 80% 이상을 차지한다. 이외에 의료방사선 피폭이 15% 정도를 차지하며 원자력 및 방사선 시설에서의 직업상 피폭이 1% 이내를 차지한다. 대부분의 방사선 피폭이 자연방사선에 의한 피폭이므로 이전의 국민들의 방사선에 대한 두려움 수준은 높지 않았다. 그러나 계속되는 원전사고와 방사능 누출로 인해 국민들의 공포와 불안이 증대되었으며 이는 일본 후쿠시마 원전사고 이후 폭발적인 증가를 보였다. 하지만 원자력 및 방사선은 특수적이고 전문적인 분야이기 때문에 일반인들의 정보 접근이 매우 제한적이므로 국민들이 정확히 이해하기에는 다소 어려움이 있었다. 이로 인해 국민들의

방사선에 대한 무지의 공포는 극대화되었으며 의료, 식품, 산업 등 다양하게 이용되는 방사선의 편익이 과소평가되었다[1]. 또한 방사선 이용 시 필요 이상의 안전비용(safety cost) 책정이 요구되었다[2]. 따라서 정확한 이해를 기반으로 일반인들의 방사선의 인체 위해도에 대한 올바른 인식이 필요하다. 이에 본 연구에서는 기존 방사선 인체 영향에 대한 정보의 한계점을 확인하고 새로운 형태의 자료로 일반인들의 방사선 인체 위해도의 정확한 이해를 도모하고자 한다.

1.2 연구의 범위

본 연구는 대표적 기호식품인 술, 담배, 커피의 핵심 구성 화학물질인 에탄올, 니코틴, 카페인을 대상으로 방사선 피폭과 동등한 위해성을 보이는 화학물질의 농도를 도출하였다. 우선 in vitro 실험을 통해 방사선 피폭 준위에 따른 생물학적 인체 영향을 확인하고 동일한 실험을 통해 에탄올, 니코틴, 카페인의 처리 농도에 따른 생물학적 위험도를 확인하였다. 다음으로, 두 실험을 통해 발생한 세포 독성에 기반하여 등 효과를 나타내는 이들 화학성분들의 방사선 동등성을 확인하였다.

방사선은 피폭 방사선량에 따라 세포 손상, 유전적 변이, 발암 등을 발생시킨다[3]. 이는 기존 연구를 통해 다원적으로 분석되었으며 에탄올, 니코틴, 카페인의 인체 영향에 대해서도 계속적인 연구가 진행 중이다[4,

5]. 방사선의 생물학적 영향은 직접적으로 방사선이 DNA 에 작용하여 세포 손상을 유발하거나 간접적으로 세포 주변의 물과 반응하여 활성산소종을 발생시켜 세포에 손상을 입힌다. 본 연구에서 사용한 X-RAY 는 대부분 활성산소종을 발생시켜 세포 손상을 일으키며 에탄올과 니코틴도 대부분의 세포 손상이 활성산소종 발생을 통해 일어난다[6, 7]. 또한 카페인도 정확한 세포 손상의 기전은 아직 밝혀지지 않았으나 활성산소종이 주요 손상 원인이라는 연구 결과가 있다[8]. 따라서 방사선의 세포 손상 기전이 에탄올, 니코틴, 카페인의 세포 손상과 기전과 유사함을 보이는 것을 확인하였으므로 방사선과 이들 화학물질의 세포 손상 정도에 대한 정량적 비교가 가능하다고 판단하였다.

세포 독성(Cytotoxicity) 측정을 위한 생물학적 검정(Biological assay)은 apoptosis assay, clonogenic assay 를 통해 수행되었으며 세포는 Mouse endothelial cell, Normal diencephalon cell 을 사용하였다. 본 연구는 동일한 세포 손상을 유발하는 방사선량과 화학물질의 농도 간의 상관관계를 도출하고 1Gy 방사선 피폭 준위와 동등한 효과를 발생시키는 화학물질의 농도를 구하였다.

제 2 장 배경이론

2.1 Radiological cell damage

방사선에 의한 세포 영향은 방사선의 물리적, 화학적 작용 후 일어나는 생물학적 작용으로 인한 표적인 DNA 에 대한 손상을 나타낸다. 이는 방사선이 표적에 직접적으로 작용하는 직접작용(Direct action)과 세포 안의 다른 물질과 반응하여 작용하는 간접작용(Indirect action)이 있다. X-RAY 흡수로 인해 발생하는 2 차 전자가 직접적으로 DNA 에 반응하여 단 가닥 절단(Single Strand Breakage) 또는 이중 가닥 절단(Double Strand Breakage) 등을 일으키거나(Direct action) 발생하는 2 차 전자가 DNA 이외의 세포 안에 다른 물질, 특히 물, 과 작용하여 활성산소종을 생성하여 이로 인한 DNA 에 손상을 유도한다(Indirect action)(Fig. 2.1 [3]). 방사선으로 과도하게 발생하는 활성산소종은 DNA 손상과 더불어 세포 주기 정지(Cell cycle arrest), 세포고사(Apoptosis), 세포 증식 억제 등을 유발한다[9].

X-RAY 는 Linear Energy Transfer(LET)가 낮기 때문에 대부분의 손상은 활성산소종에 의한 간접작용에 의해 일어나며 세포 주변 및 세포 내의 물과 반응하여 활성산소종을 생성한다. 방사선에 의해 세포에 발생하는 활성산소종은 e_{aq}^- , H^\cdot , $^{\cdot}OH$, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 을 포함한다. e_{aq}^- , H^\cdot , $^{\cdot}OH$ 은 불안정하고 반응 성이 크기 때문에 1 밀리 초 안에 주변 물질과 반응하고 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 는 상대적으로 안정하기 때문에

각각 10^1 초, $> 10^2$ 초 이상 개별적으로 존재한 후 주변 물질과 반응한다.

이러한 주변물질과의 반응을 통해 세포 손상이 일어나는 것이다[10].

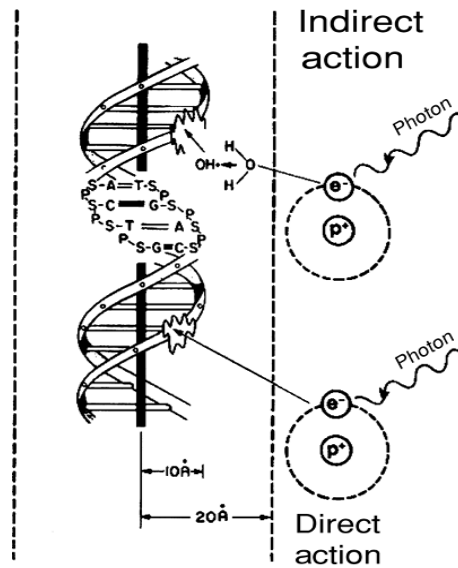


Fig. 2. 1 Direct and Indirect actions of radiation in cell.[3]

2.2 Chemical cell damage

2.2.1 Ethanol

에탄올은 세포독성을 일으키는 유해한 화학물질이다. 과도한 에탄올 섭취는 중추신경계에 변화를 일으키며 에탄올에 의해 발생하는 Free radicals 는 뇌에서의 신경계 손상을 발생시킨다[11].

에탄올의 세포 영향의 주요 표적은 단백질, 지질, DNA 이다. 여기서 에탄올에 의한 DNA 손상은 활성산소종(Reactive Oxygen Species : ROS), 지질 과산화물(Lipid Peroxidation Products : LPP), 아세트알데히드 생성으로 인해 발생한다. 그 중 에탄올에 의해 발생하는 활성산소종은 세포독성의 가장 주요한 원인이 되며 다양한 방법으로 DNA 손상을 일으킨다. 활성산소종은 DNA 에 직접적으로 작용하여 산화적 손상을 일으키거나 간접적으로는 지질에 작용하여 지질 과산화물을 생성하여 DNA 손상을 유도한다. 또한 에탄올과 활성산소종에 의해 지질에서 발생하는 과산화물(LPP)은 발암작용을 하는 부산물(Ethenobase Adducts)을 만들어 DNA 를 손상시킨다. 에탄올의 부산물로 만들어지는 아세트알데히드는 단백질의 아미노기와 결합하여 아세트알데히드-단백질 부산물을 만들며 이 부산물은 알코올성 질병의 원인이 된다. 또한 아세트알데히드는 세포 내에서 $N^2 - Et - dG$ 를 생성하여 DNA 손상을 일으킨다. (Fig. 2.2 [12])

DNA 는 활성산소종에 매우 민감하게 반응하고 가닥 절단, 세포고사 등 세포독성의 손상을 발생시키기 때문에 다른 생성물보다 DNA 손상의 지배적인 원인이 된다.

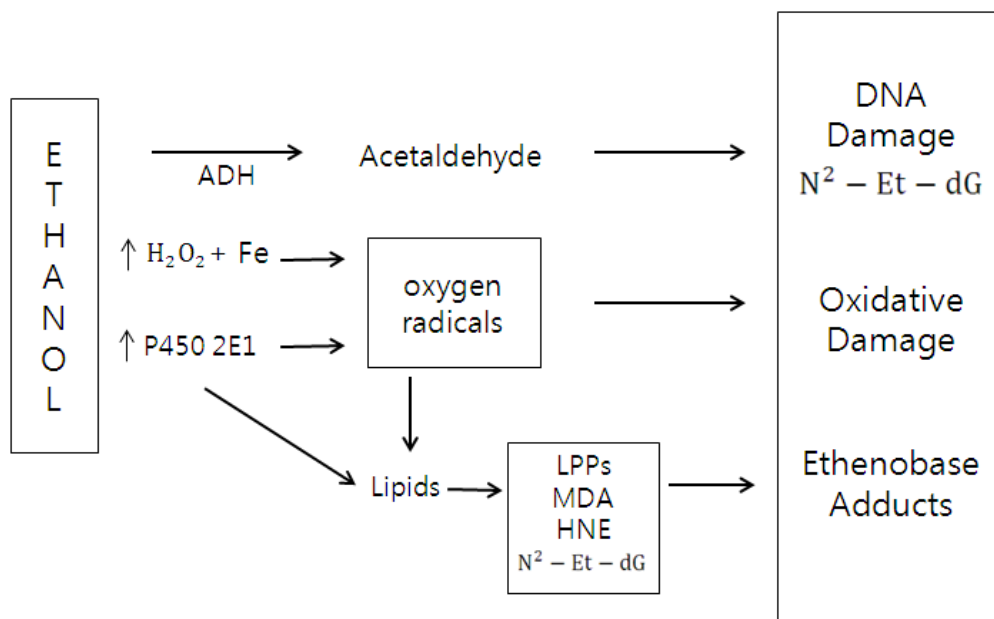


Fig. 2.2 Diagram illustrating the generation of different DNA-damaging agents as a result of chronic ethanol ingestion, and the different types of DNA damage produced. ADH, alcohol dehydrogenase; LPPs, lipid peroxidation products; MDA, malondialdehyde; HNE, 4-hydroxynonenal; $N^2 - Et - dG$, $N^2 - Ethyl - 2' - deoxyguanosine$

2.2.2 Nicotine

흡연은 호흡계질환, 심혈관질환, 폐암 등 각종 암을 유발하는 주요인이다. 특히나 흡연은 폐암의 가장 주요한 원인이며 동맥 경화증 및 대동맥류 또한 흡연이 주요 원인인 것으로 알려져 있다. 담배연기는 방향족 아민, 방향족 탄화수소, 아크로레인 등 폐포 및 호흡기관의 세포를 손상시키는 수 백 가지의 화학물질을 포함하고 있다. 이 화학물질들은 직접적으로 DNA 를 손상시키거나 세포의 대사를 방해한다 [13, 14].

그 중 니코틴은 담배의 주 성분이며 중독을 일으키는 물질이다. 담배의 주요한 알칼로이드 종류인 니코틴은 발암물질로 알려져 있으며 니코틴의 세포 손상에 대한 연구는 지속적으로 이루어 지고 있다. 또한 니코틴은 암세포에서 세포고사를 억제시켜 암세포의 증식을 유도하나 정상세포에서는 DNA 손상을 일으킨다. 니코틴에 의해 세포고사가 일어나거나 DNA 가닥 절단이 일어나 세포 손상이 일어나는데 정확한 기전에 대해서는 아직 밝혀지지 않는 것이다. 그러나 니코틴에 의한 DNA 손상은 주로 활성산소종에 의해 발생하며 이에 대한 연구는 다양한 세포를 통해 이뤄지고 있다. 또한 니코틴에 의한 DNA 손상이 주로 활성산소종에 의해 발생하므로 항산화제 처리를 통해 니코틴의 DNA 손상을 줄이는 연구도 꾸준히 이루어지고 있다[7].

니코틴으로 인한 활성산소종 생성은 담배에 의해 발생하는 산화적 스트레스의 대부분을 차지하고 in vitro 와 in vivo 에서 모두 세포손상을

일으키는 활성산소종을 생성한다[15]. 따라서 니코틴에 의해 발생하는 활성산소종은 세포 DNA 손상의 주요 원인이 되며 에탄올에 의해 발생하는 활성산소종과 마찬가지로 직접적으로 DNA 를 손상시키거나 지질 과산화물을 생성하여 세포를 손상시킨다.

니코틴이 직접적으로 세포고사를 일으키거나 DNA 손상을 일으키는 기전에 대한 연구는 여러 가지 보고되어 있으며 이를 통한 니코틴의 세포독성 평가에 대한 연구도 많이 이루어져 있다.

2.2.3 Caffeine

카페인을 대중적인 기호식품인 커피의 주 성분이다. 카페인은 중추신경계와 심장 기능을 자극하며 혈압을 조절한다. 또한 집중력을 강화시키며 피로도를 감소시키는 효과가 있다[16]. 그러나 카페인은 위에서 언급한 순기능 이외에도 세포독성과 관련하여 발암 작용, 세포고사, 세포증식억제 등의 영향을 주며 DNA 와 단백질 합성을 억제하여 DNA 회복 작용을 방해한다.

카페인의 영향에 대해서는 여전히 논쟁 중에 있지만 카페인은 오랜 연구를 통해 박테리아, 균류, 포유류 동물 세포 등에 돌연변이 유발 물질로 평가되어 왔으며 고농도에서 카페인이 세포고사 유도체가 되는 것을 확인하였다. 이는 카페인의 세포독성을 보여주는 근거가 된다[17]. 또한 카페인이 활성산소종을 생성하여 세포에 손상을 준다는 것도 연구된 바 있다. 그러나 카페인의 세포독성은 실험 재 세포에 따라 가다

절단, 염색체 이상 등 DNA 손상 기전에 차이가 있으며 어떤 세포에 있어서는 세포독성을 보이지 않는 세포도 존재한다[8]. 또한 타 연구는 포유류 세포를 사용한 in vitro 실험을 통해 카페인의 영향이 카페인 처리량 및 처리 시간에 따라 다르게 나타난다는 것을 확인하였다. 카페인 처리량이 저 농도일 경우 항산화 효과(antioxidant effect)를 나타내며 고 농도일 경우 세포독성(cytotoxicity)을 일으킨다[18]. 따라서 카페인의 세포독성 영향은 아직 정확한 기전이 밝혀지지 않았으며 다양한 연구가 진행 중이다. 하지만 이전의 여러 연구를 통해 카페인이 활성산소종을 발생하여 세포 손상을 일으키며 세포주기 정지, 세포고사 등을 유도하고 p53 와 같은 암 억제 단백질의 조절을 방해한다는 것을 밝혀내고 있다[19].

2.3 Apoptosis

세포가 죽는 과정은 세포고사(apoptosis)와 세포괴사(necrosis), 크게 이 두 가지 과정을 통해 일어난다. 세포괴사는 외부의 직접적인 화상, 타박, 독성 등의 자극으로 인해 발생하는 세포사멸(cell death)이며 세포 밖에서 수분이 유입되면서 세포가 팽창하여 파괴가 일어난다. 세포고사(apoptosis)는 유전적으로 계획된 세포 사멸(programmed cell death)로 외부 환경으로 인해 변화된 신호가 유전적 프로그램을 활성화시켜 세포를 사망에 이르게 한다[20]. 이러한 세포고사는 별개의 두 단계를 거쳐 일어나게 되는데 첫 단계는 apoptotic body 를 구성하는 것이고 두 번째 단계는 다른 세포에 의해서 apoptotic body 가 분화되는 것이다. 세포고사 과정에서 세포 핵과 세포 질은 압축되고 압축된 세포는 조각으로 부서지게 되며 이렇게 부서진 세포 조각은 주변 세포에 의해 제거된다. 이를 통해 세포고사로 인해 발생할 수 있는 독성을 제거함으로써 다른 세포의 손상 위험을 없앤다. (Fig.2.3 [21])

세포에 발생하는 화학물질, 방사선, 열, 저 산소 환경, 삼투압 등과 같은 외부 자극은 세포고사 발생과정에서 세포의 암 억제 유전자 p53 을 발현시킨다. p53 은 외부 자극으로 인해 결손이 생긴 세포를 제거하기 위하여 세포 주기 정지를 하여 DNA 회복 또는 세포고사를 유도한다. 이러한 p53 에 의해 유도되는 세포고사는 Bax, CD95, DR5, IGF-BP3, NOXA, p53AIP1, Rpr 단백질의 상호작용으로 발생하며

p53 이 외에도 다양한 기전을 통해 세포고사가 발생한다[22]. 따라서 세포는 세포고사의 과정으로 손상된 세포를 자발적으로 제거함으로써 손상된 세포의 증식을 막고 주변의 정상 세포의 손상을 막는 역할을 한다.

세포고사는 외부자극에 민감하게 반응하는 인자이기 때문에 여러 연구에서 세포 독성을 비교하는 방법으로 사용하고 있다. 특히나 방사선 반응에 민감하게 반응하므로 Linear Energy Transfer (LET)에 따른 생물학적 영향을 나타내는 Relative Biological Effectiveness (RBE)를 구하는 과정에서 많이 쓰이고 있다[23, 24].

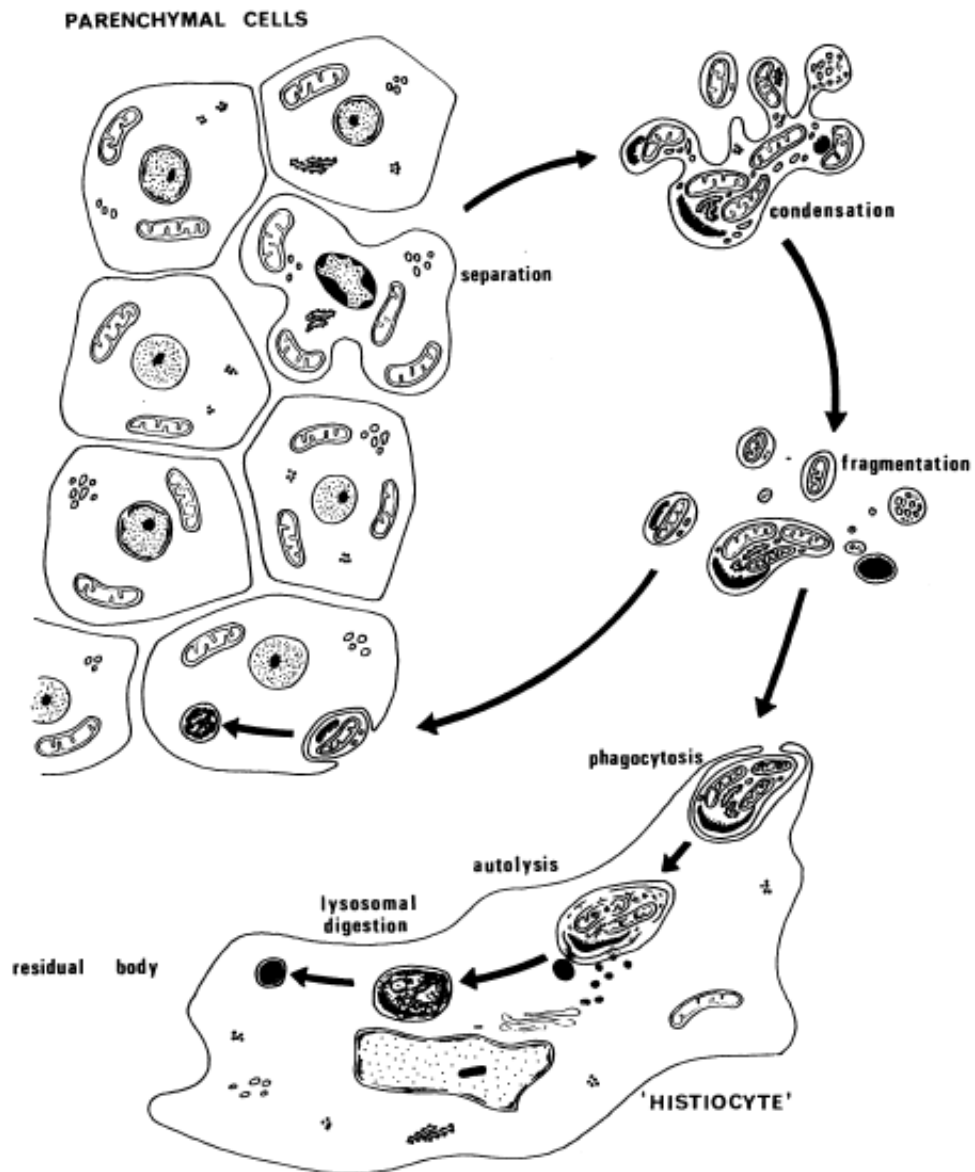


Fig 2. 3 Diagram to illustrate the morphological features of apoptosis

2.4 Survival curve / Linear quadratic model[3]

세포의 생존은 세포가 증식능력을 가지고 있다는 것을 의미한다. 일반적으로 하나의 세포가 세포군집(colony)을 형성하는 것을 세포의 증식능력을 평가하기 위한 방법으로 사용한다. 외부 영향, 특히 방사선의 영향에 따른 세포의 증식 능력 상실은 생존 곡선(survival curve)으로 표현되며 생존율(surviving fraction)로 구해진다.

생존율의 공식은 아래와 같다.

$$\text{Surviving Fraction} = \frac{\text{Number of colonies}}{\text{Number of cells seeded} \times PE/100}$$

그러나 세포를 seeding 한 후 생성된 세포군집을 셀 때 방사선 처리를 하지 않은 세포들이 모두 세포군집을 형성하는 것이 아니다. 따라서 이를 보정해야 하는 값이 필요한데 이를 Plating efficiency(PE)라 한다. PE 는 외부 처리가 되지 않은 세포를 seeding 하였을 때 세포군집을 형성하는 비율을 나타낸다.

$$PE = \frac{\text{Number of colonies counted}}{\text{Number of cells seeded}}$$

생존 곡선은 linear-quadratic model 로 표현된다. Linear -quadratic model 은 방사선에 의한 세포 사멸의 두 가지 요인을 나타낸다. 하나는 방사선량에 비례하는 값이며 또 다른 하나는 방사선량의 제곱의 값에 비례하는 값이다.

따라서 생존 곡선은 아래의 공식으로 표현한다.

$$\text{Surviving Fraction} = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

제 3 장 대상 및 방법

3.1 Cell and Cell culture

일반적인 방사선의 피폭상황과 널리 소비되는 기호식품 속 화학물질의 위해도를 비교하기 위해 정상 조직 환경에서의 세포 영향평가에 필요한 정상세포를 실험 재료 지정하였다.

본 연구에 사용한 정상세포는 혈관내피세포로 ATCC 에서 판매하는 Mouse Endothelial Cells(ATCC, CRL-2161)을 사용하였다. 또한 장기세포가 아닌 혈관내피세포의 특수성을 보정하고자 정상 간뇌 세포 Normal Diencephalon Cell; Brain Normal Cells(ATCC, CRL-2005)을 사용하여 실험을 진행하였다.

각 세포는 세포 특성을 고려하여 각각 다른 배양액 환경을 조성하여 배양하였다. Normal Diencephalon Cell 은 90% Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)(GIBCO)와 10% fetal bovine serum(FBS)(GIBCO)을 혼합한 배양액에 배양하였다. Mouse Endothelial Cells 는 90% Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)(GIBCO)와 10% fetal bovine serum(FBS)(GIBCO)에서 배양하였으나 10%의 FBS 는 56°C 에서 Heat-inactivated 처리를 하여 사용하였다. 두 세포는 동일한 환경인 온도 37°C, 10% CO_2 의 조건으로 조성된 incubator 에서 배양하였다. 또한 세포는 Colony formation

method(clonogenic assay)를 제외한 모든 환경에서는 T-25 culture Flask(NUNC)에서 배양하였으며 세포군집 형성 시에는 35mm Culture Dish(NUNC)에서 배양하였다.

3.2 Irradiation

실험에서 사용한 방사선 조사 장치는 서울대학교 원자핵공학과 방사선생명공학연구실에 설치된 YXLON MODEL 450-D08 장치이다. 이 장치에서 발생하는 X-RAY 선량 및 선량율은 Gafchromic EBT Film 을 이용한 선량보정(Dose Calibration)을 통해 계산되었다

본 연구에서 기준으로 사용한 장치 운전 전압은 200kVp 이며 운전 전류는 10mA 이다. 이는 분당 약 1.58Gy 의 X-RAY 를 발생시키며 모든 실험에서 최대 방사선량을 8Gy 까지 조사하였다.

3.3 Chemical treatments

3.3.1 Ethanol

실험에서 사용한 에탄올은 Hitech Pharm 에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 에탄올은 순도 79.15%, 밀도 0.8g/ml 이며 에탄올의 화학식은 C_2H_5OH 이며 화학식량은 46.069g/mol 이다.

T-25 culture Flask 에 분주된 세포가 T-Flask 표면적에 2/3 을 차지할 정도로 분화되었을 때 실험을 진행하였다. 모든 실험에서 T-Flask 에는 3ml 의 배양액이 들어있으며 이 배양액에 에탄올을 투여하여 37°C, 10% CO₂incubator 에 24 시간 배양하였다.

Table 3.1 Ethanol treatment doses and time.

실험 세포	에탄올 처리량	처리시간
▪ Mouse Endothelial Cells	0 µl*	24 시간
	13 µl	
	26 µl	
▪ Normal Diencephalon Cell	65 µl	
	130 µl	
	260 µl	

(* : 대조군)

이 때 에탄올 260 μl 을 3ml 의 배양액에 투여했을 때 세포 생존
 량(Cell Viability)이 10% 이하로 감소하여 결과 값 분석 시 에탄올 260
 μl 처리 시를 제외하였다.

3.3.2 Nicotine

니코틴은 Sigma Aldrich 에서 구입한 (-)-Nicotine 을 사용하였다.
 니코틴의 실험식은 $C_{10}H_{14}N_2$ 이며 분자량은 162.23 g/mol 이다. 이
 물질은 수용성이 있기 때문에 증류수(Distilled Water)에 희석하여
 사용하였다. 1ml 증류수 당 100 μl 의 니코틴을 혼합하여 수용액을
 준비하였다. 또한 8 μl 의 니코틴을 3ml 의 배양액에 투여한 결과 세포
 생존 량(Cell Viability)이 방사선 조사에 따른 세포 생존 량(Cell
 Viability)과 비교할 수 없을 정도로 매우 낮게 측정되기 때문에 실험
 결과 분석 시에는 니코틴 처리 최대량을 6 μl 로 정하였다.

Table 3.2 Nicotine treatment doses and time.

실험 세포	니코틴 처리량	처리시간
▪ Mouse	0 μl *	24 시간
Endothelial Cells	2 μl	
	4 μl	
▪ Normal	6 μl	
Diencephalon Cell	8 μl	

(* : 대조군)

3.3.3 Caffeine

카페인은 Sigma Aldrich 에서 caffeine powder 를 구입하여 사용하였다. 카페인은 $C_8H_{10}N_4O_2$ 로 분자량이 194.19 g/mol 이다. 물에 15mg/ml 까지 용해되기 때문에 1ml 증류수 당 10mg 을 녹여 사용하였다. 카페인은 세포에서 카페인 농도가 5mM 이상일 때 세포 손상을 일으켜 세포고사를 발생시킨다. 하지만 5mM 보다 낮은 농도에서는 항산화(Antioxidant) 역할을 하며 세포 생존율을 상승시킨다[25]. 따라서 본 연구에서는 5mM 에 해당하는 카페인의 양은 배양액 3ml 당 약 2.9mg 이므로 이를 기준으로 2.9mg 이상 및 이하의 카페인 처리량을 배양액에 투여하였다.

Table 3.3 Caffeine treatment doses and time.

실험 세포	카페인 처리량	처리시간
▪ Mouse	0mg	24 시간
Endothelial Cells	2mg	
	4mg	
▪ Normal	6mg	
Diencephalon Cell	8mg	

(* : 대조군)

본 연구에서는 세 개의 서로 다른 화학물질 처리량을 비교하기 때문에 각각 다른 처리량 단위를 사용할 경우 정확한 비교가 어려우므로 결과값에서는 몰 농도의 단위로 환산하여 비교하였다(Table 3.4).

Table 3.4 Chemical treatment doses with molarity

에탄올 처리량	카페인 처리량	니코틴 처리량
0mM	0mM	0mM
59mM	4mM	3.2mM
118mM	8mM	6.1mM
291mM	12mM	8.6mM
571mM		10.8mM

3.4 Apoptosis analysis

세포고사 발생 백분율(Apoptotic cell percentage)를 구하기 위해 Millipore 사에서 구입한 Muse™ cell analyzer 를 사용하였다. 세포가 방사선, 화학물질, 열 등의 외부 자극을 받으면 세포 내부의 특징적인 생리학적 변화가 발생한다. 이러한 내부의 변화 중 Phosphatidylserine(PS)의 표면화가 발생한다. 세포고사로 인해 세포막 안에 있던 PS 가 세포의 표면으로 나오게 되며 Annexin v 는 PS 와 친화성이 큰 단백질로 내부의 PS 가 세포 내의 세포고사 발생으로 인해 표면화되면 PS 와 결합한다[26].

본 연구에서는 위의 원리를 이용하여 세포고사를 측정하였다. 방사선과 화학물질 처리 후 24 시간 배양하였으며 PS 표면화가 일어난 세포를 Annexin v 을 사용하여 20 분간 염색하였으며 이를 Muse™ cell analyzer 를 이용하여 세포고사가 발생하여 염색된 세포의 세포고사 발생 백분율을 구하였다.

3.5 Clonogenic assay

Clonogenic assay 는 단일 세포가 군집(colony)을 형성하는 증식을 이용하여 세포의 생존을 평가하는 방법이다. 여기서 세포 군집은 적어도 50 개의 세포 이상으로 구성되는 것을 의미한다. 또한 clonogenic assay 는 세포가 방사선이나 독성물질에 처리 된 후 세포의 생식 능력 파괴를 판별하는 중요한 방법이다.

본 연구에서는 세포의 생존율을 구하기 위해 clonogenic assay 를 사용하였다. 실험 시 세포 처리를 위해 T-25 culture Flask 에 세포를 배양하였다. 이 때 T-25 culture Flask 당 배양액을 3ml 씩 처리하였다. T-25 culture Flask 에서 방사선 조사와 화학물질 처리를 한 후 24 시간 후에 세포군집 형성을 관찰하기 위해 35mm Culture Dish 에 적정량의 세포를 seeding 하였다. 35mm Culture Dish 에도 배양액을 각각 3ml 씩 처리하였으며 3~4 일 후에 배양액을 교체하였다. 그 후 세포군집 형성을 위해 약 1~3 주간 incubator 에 배양하였다. 형성된 세포군집은 에탄올을 사용하여 고정하였으며 Giemsa 용액(Sigma-Aldrich)을 사용하여 염색하였다. 세포 군집은 digital colony counter (KT 0074A)를 이용해 구하였으며 이 때 세포 군집의 세포 수가 50 개 미만일 때는 계산에서 제외하였다.

3.6 Statistical Analysis

모든 결과 값은 평균값±표준편차로 표현하였다. 그리고 통계적 비교를 위해 T 검정을 사용하였으며 p 값이 0.05 이하의 결과값을 이용하여 유의미적 차이를 판단하였다.

제 4 장 결과 및 분석

본 연구에 사용한 화학물질이 세포에 미치는 영향은 대부분 DNA 손상으로 활성산소종 생성으로 인한 산화적 스트레스가 주요 원인이다. 이외에도 세포 증식 억제, 효소 생성으로 인한 손상 등 여러 가지 원인을 통해 세포에 영향을 준다. 이러한 활성산소종에 의해 발생하는 세포 손상의 기전이 방사선의 세포 손상과 유사한 원리로 작용하고 있으며 특히 실험에 사용한 X-RAY는 low LET로 X-RAY에 의한 세포 손상은 대부분 활성산소종에 의해 발생한다. 따라서 방사선과 화학물질의 생물학적 영향을 알아보기 위해 생물학적 검정(Biological assay)으로 apoptosis assay, clonogenic assay를 사용하여 세포독성을 관찰하였다. 카페인의 경우 활성산소종 발생으로 인한 세포독성에 대한 연구가 있으나 세포에 따른 세포독성 발현에 차이가 있으므로 apoptosis assay와 clonogenic assay를 통해 세포독성 발생을 확인 한 후 이 후 실험을 진행하였다

이 때 방사선질(quality)이 다른 두 방사선이 동일한 생물학적 영향을 일으킬 때의 흡수선량을 구하여 그 차이를 선량의 비율로 나타내는 Relative Biological Effectiveness (RBE) 개념을 적용하여 X-RAY와 화학물질의 세포에 대한 생물학적 효과를 비교하였다[27]. 다시 말해 동일한 생물학적 영향을 일으키는 방사선량과 화학물질 농도를 구하여 그 값을 비교하였다. RBE 값은 기본적으로 생존율(Surviving Fraction)로 비

교하나, 이외에도 세포고사, 염색체 이상 등을 통해 비교한다. 세포고사와 생존율(surviving fraction)를 통한 비교는 기존 연구를 통해 생물학적 영향 평가의 endpoint로 많이 활용되고 그 근거가 마련되어 있으므로 본 연구에서는 세포고사와 생존율(surviving fraction)을 구하여 생물학적 영향을 비교하였다[28, 29].

4.1 Dose-dependent time-dependent apoptotic cell death.

Fig. 4. 1 은 24 시간동안 에탄올, 니코틴, 카페인 처리를 한 Mouse Endothelial Cells 과 X-RAY 를 조사한 Mouse Endothelial Cells 의 세포고사 발생 백분율을 나타낸 그래프이다. 또한 Fig. 4. 3 는 Normal Diencephalon Cell 에 동일한 처리를 하여 발생한 세포고사 발생 백분율을 나타낸 그래프이다.

Fig. 4. 1 에서 니코틴, 카페인의 농도가 증가함에 따라 세포고사 발생 백분율이 증가하는 것을 관찰하였다. 또한 X-RAY 선량이 증가하면서 세포고사 발생 백분율도 증가하였다. 이 때 모든 값을 대조군과 비교하였을 때 p 값이 0.05 미만으로 나와 그 값이 유의미적 차이를 보인다는 것을 확인하였다. 따라서 니코틴, 카페인, X-RAY 의 경우 농도 및 선량이 증가할수록 세포고사 발생 백분율도 증가한다는 것을 알 수 있다. 그러나 에탄올의 경우 농도가 증가할수록 세포고사

발생 백분율이 증가하는 경향성이 보이거나 대조군과 비교하여 p 값이 0.05 이상으로 나와 그 값이 유의미적 차이를 보이지 않았다. 그러나 에탄올의 농도를 더 증가시켜 실험을 진행한 결과 Fig. 4. 2에서 보이는 바와 같이 에탄올의 농도가 기준 값 이상일 때 세포고사 발생 백분율이 급격히 증가하는 것을 알 수 있으며 이를 통해 에탄올의 농도가 증가할수록 세포고사 발생 백분율도 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 Mouse Endothelial Cells 의 경우 에탄올의 농도가 작을 경우 세포독성 민감성은 작지만 에탄올의 농도가 증가할수록 세포고사 발생 백분율이 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 Fig. 4.3 의 결과를 통해 Normal Diencephalon Cell 에서도 Mouse Endothelial Cells 과 마찬가지로 에탄올, 니코틴, 카페인의 농도가 증가할수록, X-RAY 선량이 증가할수록 세포고사 발생 백분율이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 모든 결과 값은 p 값이 0.05 보다 작아 농도 및 선량에 따른 세포고사 발생 백분율이 유의미적으로 증가함을 알 수 있었다.

따라서 Mouse Endothelial Cells 과 Normal Diencephalon Cell 에서 세포고사 발생 백분율은 방사선량 및 화학물질의 농도가 증가함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있으며 세포고사 발생 백분율이 농도 및 선량에 따른 세포독성을 비교할 수 있는 검증방법이 될 수 있다고 판단하였다.

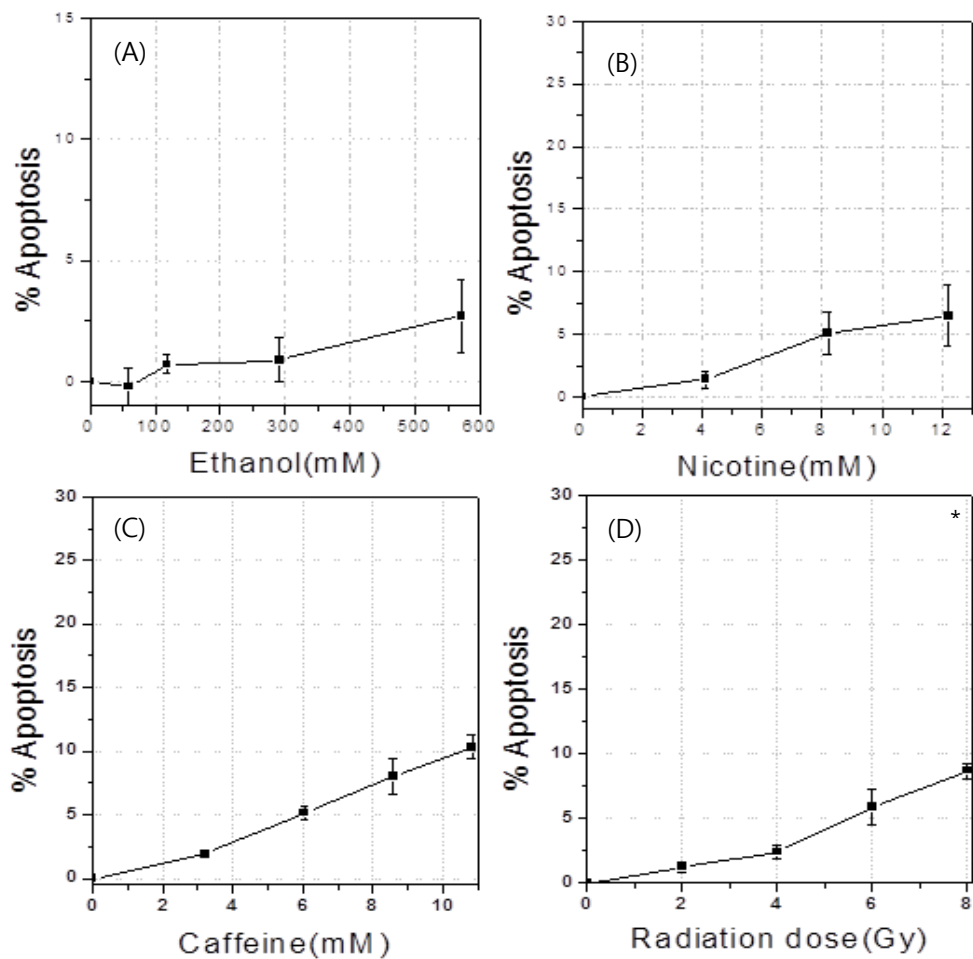


Fig. 4.1 Percent apoptosis of Mouse Endothelial Cells observed after exposure to (A) ethanol, (B) nicotine and (C) caffeine for 24 hours in incubator. Mouse Endothelial Cells were incubated for 24 hours after irradiation (D). The error bars indicate one standard deviation.

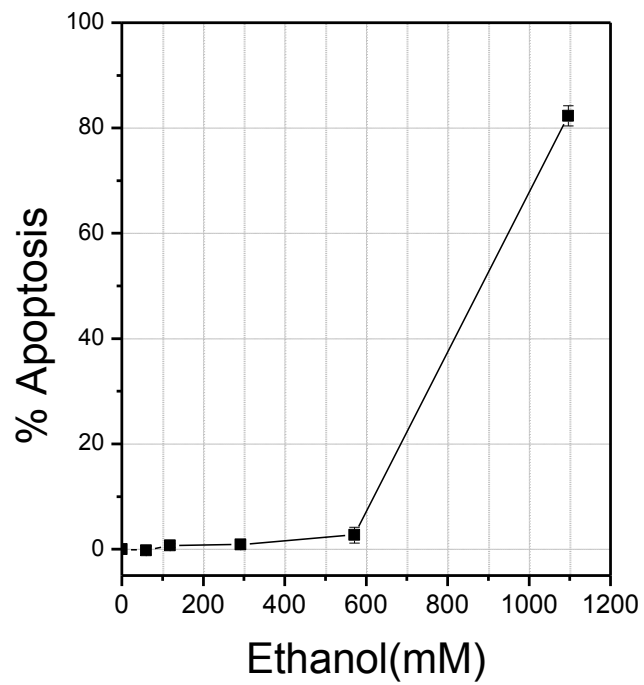


Fig.4.2 Percent apoptosis of Mouse Endothelial Cells observed after exposure to ethanol for 24 hours. The data of ethanol-1096mM was added for inferring tendency of dose-dependent apoptosis.

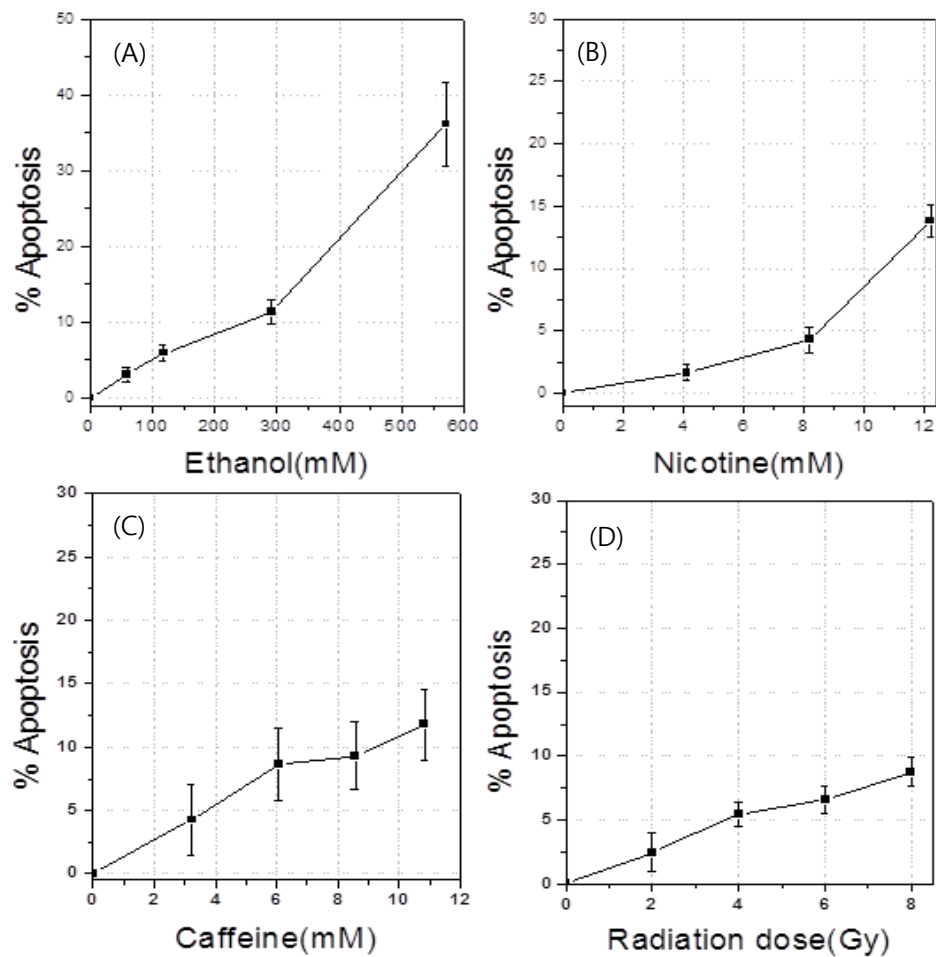


Fig.4.3 Percent apoptosis of Normal Diencephalon Cells observed after exposure to(A) ethanol, (B)nicotine and (C)caffeine for 24hours in incubator. Normal Diencephalon Cells were incubated for 24 hours after irradiation (D). The error bars indicate one standard deviation.

4.2 Dose –response analysis of apoptotic cell death

Fig. 4. 4 과 Fig. 4. 5 은 각각 Mouse Endothelial Cells 과 Normal Diencephalon Cells 의 에탄올, 니코틴, 카페인의 농도와 X-RAY 선량에 따른 세포고사 곡선이다. 이 곡선은 실험을 통해 구한 세포고사 발생 백분율의 결과값(Fig. 4. 1, Fig. 4. 3)을 근사한 곡선으로 linear-quadratic model 에 근사하였다[30, 31]. 여기서 R-square 값을 0.93 이상으로 하여 실험 결과값에 가장 적합한 곡선을 근사하였다.

일반적으로 X-RAY 선량에 따른 세포의 생물학적 효과에 대한 가장 적합한 근사는 linear-quadratic model 이다. 이는 X-RAY 의 LET 값이 작아 X-RAY 에 의한 세포 손상이 선량에 비례하여 발생하는 것이 아니라 손상 회복 작용도 일어나기 때문에 linear-quadratic model 이 가장 적합하기 때문이다. 이 때 큰 LET 값을 가지는 중성자 같은 방사선의 생물학적 영향은 이중 가닥 절단과 같이 단 가닥 절단보다 세포 손상의 회복이 어려운 상태로 발생하기 때문에 선량에 비례하게 세포 손상이 발생하는 것을 나타내는 linear model 을 이용하여 근사한다. 따라서 본 연구에서 사용한 방사선원은 X-RAY 이므로 선량에 따른 세포고사 발생 백분율의 값을 linear-quadratic model 로 근사하였다. 또한 연구에 사용한 화학물질인 에탄올, 니코틴, 카페인의 생물학적 영향 기전은 직접적으로 DNA 를 손상시키는 것 보다

활성산소종 생성이나 세포 손상 단백질을 발생시켜 세포 손상을 일으키므로 X-RAY 와 같이 linear-quadratic model 로 근사하였다.

Table 4.1 은 Fig. 4.4 의 곡선에 대한 식을 나타낸 표이다. Mouse Endothelial Cells 의 세포고사 발생 백분율의 추세 곡선 식과 계수를 정리하였다. Table 4.2 는 Fig. 4. 5 의 곡선에 대한 식을 나타낸 표이며 이는 Normal Diencephalon Cells 의 추세 곡선 식이다. 이 식을 통해 1Gy 의 X-RAY 가 발생시키는 세포독성을 세포고사 발생 백분율로 나타내면 Table 4.3 과 같다. Mouse Endothelial Cells 은 1Gy 의 X-RAY 로 0.42% 세포고사가 발생하며 Normal Diencephalon Cells 은 1.39% 세포고사가 발생하였다. 이를 통해 Normal Diencephalon Cells 이 Mouse Endothelial Cells 에 비해 방사선 민감도가 크다는 것을 확인 할 수 있다. Table 4.3 에서는 1Gy 의 X-RAY 의 세포독성과 화학물질의 세포독성을 비교하기 위하여 1Gy 의 X-RAY 와 동일한 세포고사 발생 백분율을 발생시키는 화학물질의 농도를 구하였다. Mouse Endothelial Cells 과 Normal Diencephalon Cells 에서 모두 카페인, 니코틴, 에탄올의 순으로 세포독성이 나타났다. 특히나 에탄올의 세포독성이 카페인, 니코틴에 비해 현저히 낮음을 확인할 수 있다.

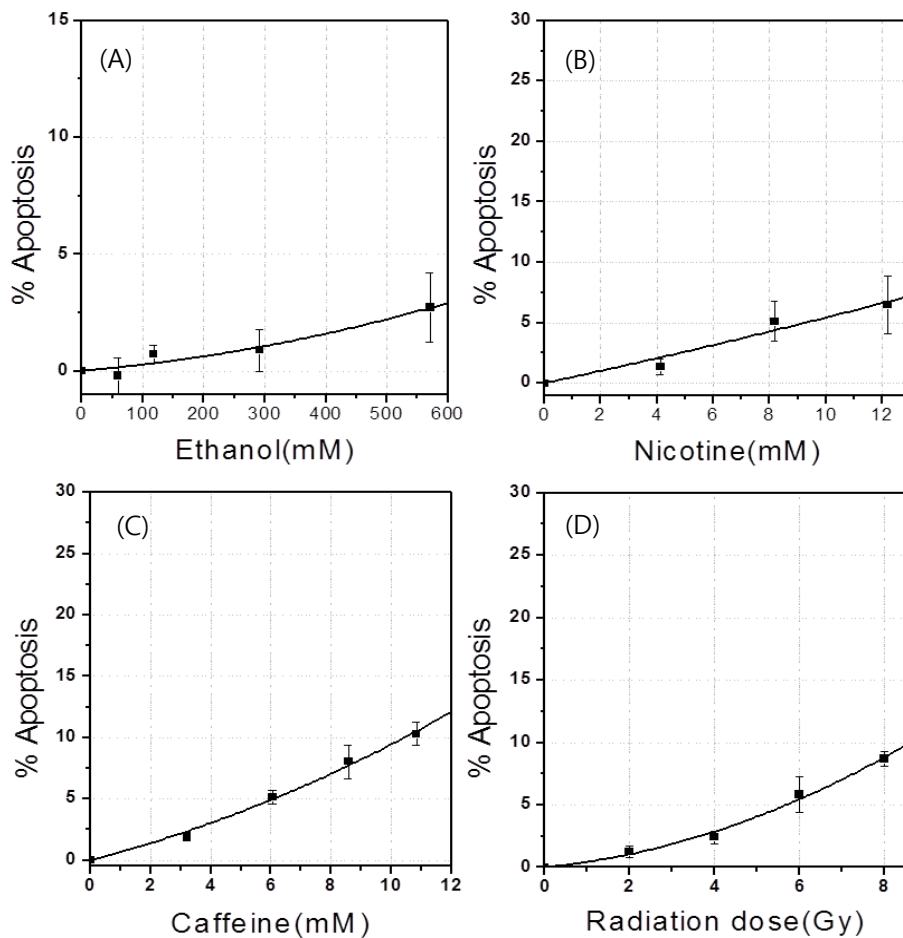


Fig.4.4 Percent apoptosis of Mouse Endothelial Cells observed after exposure to (A)ethanol, (B)nicotine and (C)caffeine for 24hours in incubator(dots). Mouse Endothelial Cells were irradiated and incubated for 24hours(D). The solid lines are the second order polynomial curves (linear-quadratic model) fitting experimental data points. The error bars indicate one standard deviation.

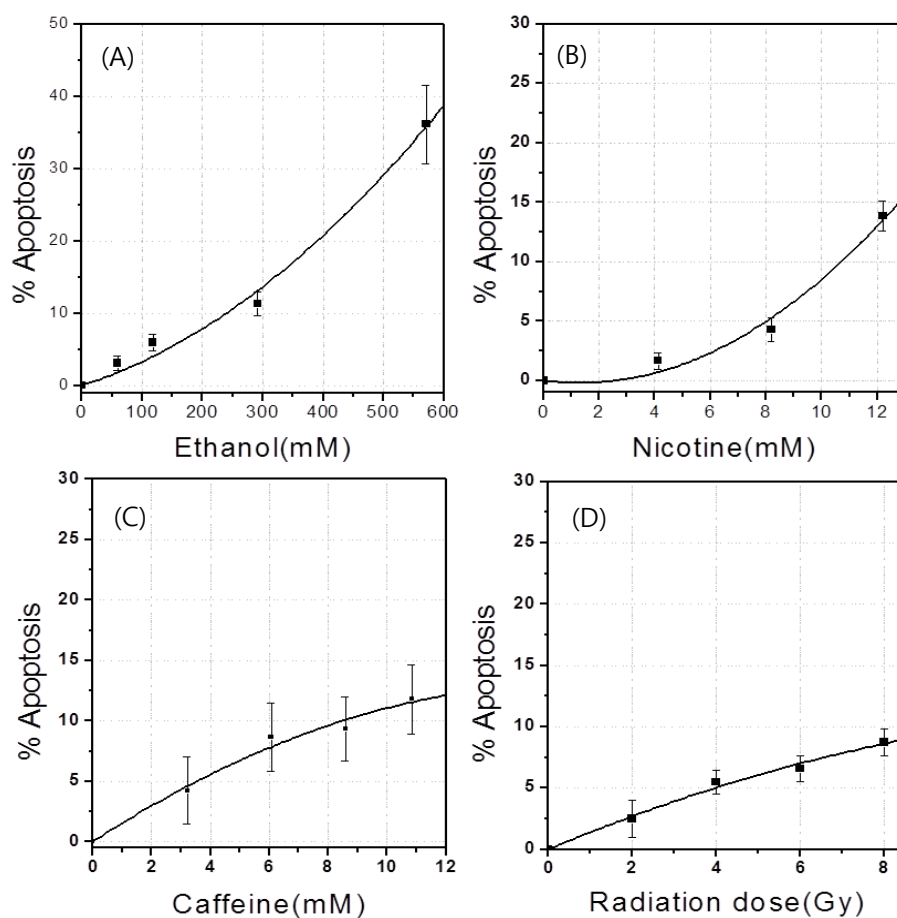


Fig.4.5 Percent apoptosis of Normal Diencephalon Cells observed after exposure to (A)ethanol, (B)nicotine and (C)caffeine for 24hours in incubator(dots). Normal DiencephalonCells were irradiated and incubated for 24hours.(D)The solid lines are the second order polynomial curves (linear-quadratic model) fitting experimental data points. The error bars indicate one standard deviation.

Table 4.1 Coefficients of linear-quadratic curves for percent apoptosis
of Mouse Endothelial Cells

		α	β
Mouse Endothelial Cells	Ethanol	0.00221	4.4175E-6
	Nicotine	0.49512	0.00467
	Caffeine	0.63093	0.03137
	X-ray	0.3259	0.09723

Linear-Quadratic model : Percent apoptosis = $\alpha D + \beta D^2$

Table 4.2 Coefficients of linear-quadratic curves for percent apoptosis
of Normal Diencephalon Cells

		α	β
Normal Diencephalon Cells	Ethanol	0.02646	6.34355E-5
	Nicotine	-0.30315	0.11544
	Caffeine	1.59013	-0.04846
	X-ray	1.43539	-0.04476

Linear-Quadratic model : Percent apoptosis = $\alpha D + \beta D^2$

Table 4.3 Chemical doses equivalent to 1 Gy of radiation dose in apoptotic cytotoxicity with Mouse Endothelial Cells and Normal Diencephalon Cells in vitro.

		X-ray	Ethanol	Nicotine	Caffeine
Mouse					
Endothelial	0.42%	1Gy	147.8mM	0.85mM	0.65mM
Cells	Apoptosis				
Normal					
Diencephalon	1.39%	1Gy	47.2mM	5mM	0.9mM
Cells	Apoptosis				

4.3 Dose -response analysis of clonogenic cell survival

Fig 4.6 과 Fig. 4.7 는 화학물질과 방사선의 Mouse Endothelial Cells 과 Normal Diencephalon Cells 에 대한 clonogenic survival fraction 의 영향을 나타낸 그래프이다. 화학물질의 농도 및 방사선량에 따른 생존율은 linear-quadratic model ($s = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$) 을 이용하여 근사하였다. 또한 세포고사 발생 백분율과 마찬가지로 식을 통해 1Gy 의 X-RAY 가 발생시키는 생물학적 영향을 구하였다. Table 4.4 의 결과를 통해 1Gy 의 X-RAY 가 Mouse Endothelial Cells 의 생존율이 0.86 으로 감소하고 Normal Diencephalon Cells 의 생존율이 0.82 으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 근사한 그래프를 이용하여 X-RAY 1Gy 와 동일한 세포독성을 나타내는 에탄올, 니코틴, 카페인의 농도를 도출하였다. 세포고사 발생 백분율과 마찬가지로 카페인이 가장 큰 세포독성을 보이고 이를 따라 니코틴, 에탄올의 순으로 세포독성을 보였다.

그래프의 shoulder 부분은 세포 손상의 회복 정도를 나타내는데 shoulder 의 곡률이 작을수록 세포 손상의 회복이 크다는 것을 의미한다. 그래프가 선형에 가까워지면 방사선 및 화학물질의 세포 손상이 직접적으로 생존율에 영향을 주는 것을 의미한다. Fig. 4.6 과 Fig. 4.7 의 결과를 통해 카페인의 shoulder 부분이 제일 작은 것을 알 수 있고, 특히나 Normal Diencephalon Cells 에서 카페인 처리 시 생존율은 거의

선형에 가까워 카페인이 회복이 어려운 직접적 세포 손상에 작용하는
것이라 판단할 수 있다.

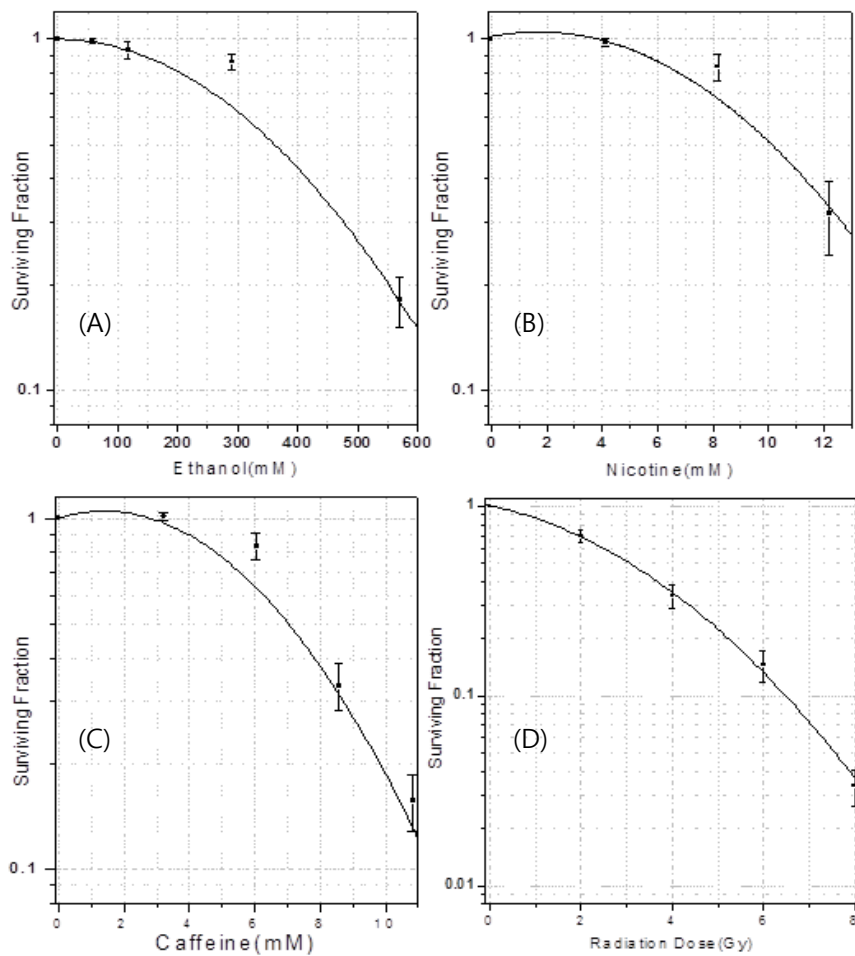


Fig.4.6 Clonogenic surviving fractions of Mouse Endothelial Cells observed after 24h exposure to (A)ethanol, (B)nicotine, (C)caffeine and (D)radiation (dots). The lines are the linear-quadratic curves fitting experimental data. The error bars indicate one standard deviation.

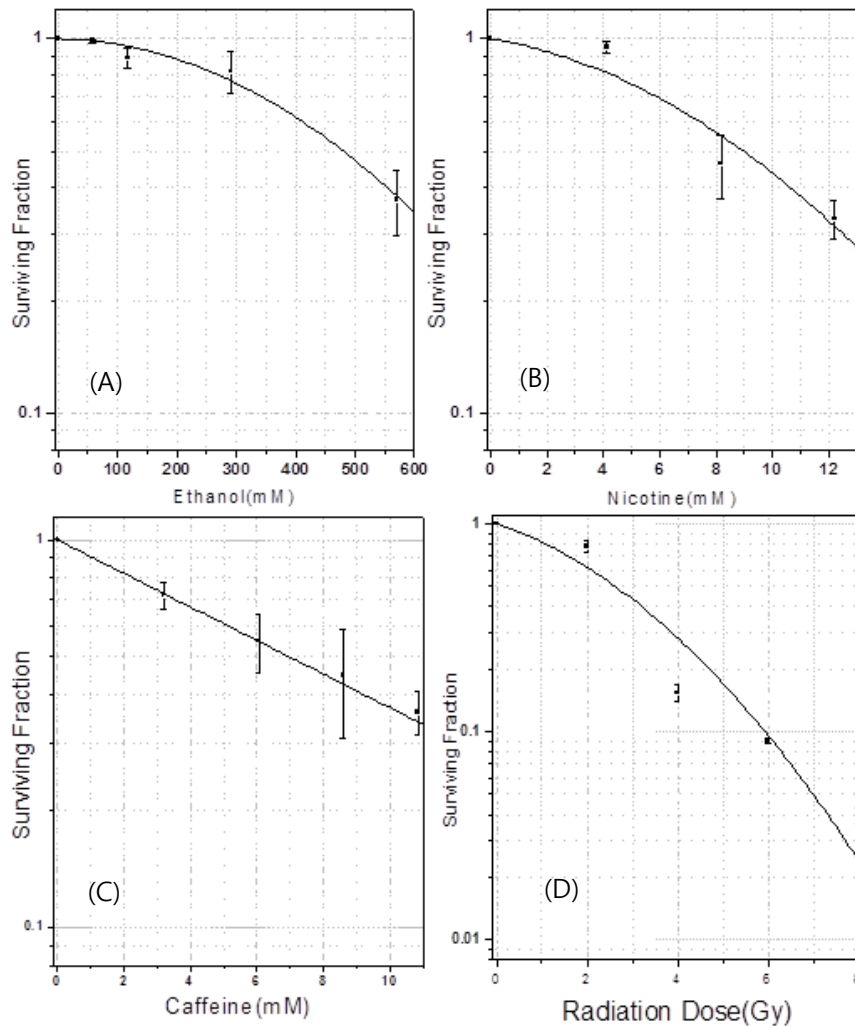


Fig.4.7 Clonogenic surviving fractions of Normal Diencephalon Cells observed after 24h exposure to (A)ethanol, (B)nicotine, (C)caffeine and (D)radiation (dots). The lines are the linear-quadratic curves fitting experimental data. The error bars indicate one standard deviation.

Table 4.4 Chemical doses equivalent to 1 Gy of radiation dose
in surviving fraction
with Mouse Endothelial Cells and Normal Diencephalon Cells in vitro.

		X-ray	Ethanol	Nicotine	Caffeine
Mouse	86%				
Endothelial Cells	Clonogenic Cell survival	1Gy	169.2mM	5.9mM	4.3mM
Normal	82%				
Diencephalon Cells	Clonogenic Cell survival	1Gy	256.5mM	4mM	2mM

4.4 Calculation of radiation-equivalency of chemical

Table 4.3 과 Table 4.4 에서 세포고사 발생 백분율과 생존율을 이용하여 동일한 세포독성을 발생시키는 방사선량과 화학물질의 농도를 구하였다. 이를 세포고사 발생 백분율과 생존율에서 동일한 세포독성을 발생시키는 방사선량과 화학물질 농도의 관계 그래프를 도출하였다.

Fig.4. 8 은 동일한 세포고사 발생 백분율을 나타내는 방사선량과 화학물질의 농도의 관계를 나타낸 그래프와 동일한 생존율을 나타내는 방사선량과 화학물질의 농도의 관계를 나타낸 그래프이다. 세포고사 발생 백분율을 통해 구한 방사선량과 화학물질 농도의 관계는 Mouse Endothelial Cells 과 Normal Diencephalon Cells 간의 차이가 크다. 에탄올과 카페인의 경우, 방사선량과 화학물질의 농도가 증가할수록 세포간의 차이가 크게 나타나고 니코틴의 경우, 방사선량이 작을수록 세포간의 차이가 큰 것을 확인할 수 있다. 니코틴의 처리 시 방사선량과 화학물질의 농도가 증가할수록 세포간의 차이가 줄어드는 것을 보이나 방사선량이 8Gy 이상이 된 후에는 다시 세포간의 차이가 커지는 것을 추측할 수 있다. 또한 동일한 생존율을 나타내는 방사선량과 화학물질의 농도를 통해 구한 관계 그래프에서도 방사선량과 화학물질의 농도가 증가할수록 세포간의 차이가 큰 것을 알 수 있다. 그러나 이 그래프에서는 저 선량의 경우(< 2Gy) 세포간의 차이가 거의 없음을 확인할 수 있다. 따라서 생존율을 통해 구한 방사선량과 화학물질의

농도 간의 관계식은 저 선량의 경우 세포간의 차이가 없이 관계 값을 나타낼 수 있다고 판단된다.

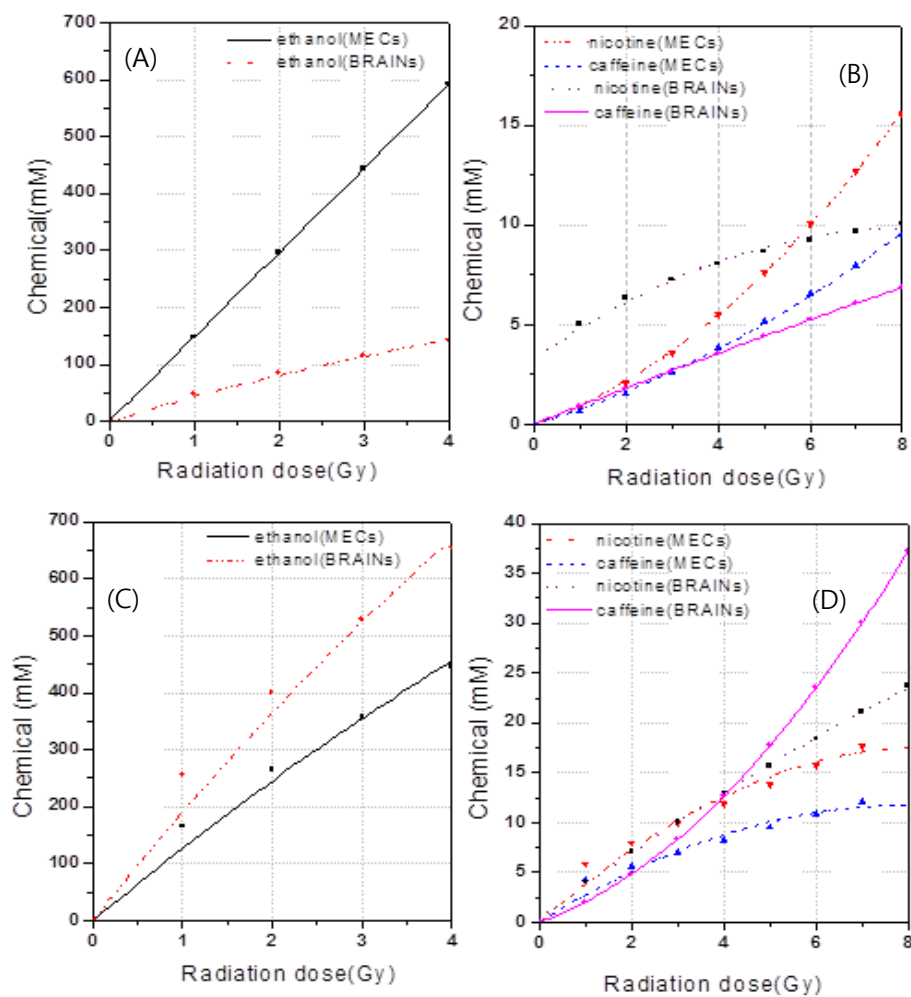


Fig.4.8 calculation of radiation-equivalency of ethanol, nicotine, caffeine inducing same (A,B) percent apoptosis and (C,D) surviving fraction

제 5 장 결론

현재 방사선의 인체 영향에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 그러나 이러한 연구결과에도 불구하고 일반인들의 방사선의 피폭 및 인체 영향에 대한 정확한 이해가 부족한 실정이다. 일례로 일본 후쿠시마 사고 이후 일반인들은 다양한 매체를 통해 방사선량 및 피폭 기준치에 대한 정보를 지속적으로 접하였으나, 정확한 이해가 부족하여 여전히 방사선에 대해 과장된 두려움에 사로잡혀 있으며, 이러한 두려움은 방사선에 대한 무조건적인 배타성을 낳고 있다. 이러한 일반인들의 인식은 방사선에 대한 오해 및 부족한 이해로 인해 발생되었다는 분석이 있으며 이는 방사선 피폭량 및 발생하는 장해에 대한 일반인들의 정확한 이해가 필요함을 상기시켰다.

기존의 방사선의 인체 영향에 대한 연구는 방사선량에 따라 인체에 발생하는 장해에 대한 연구로 국한되어왔으며 이러한 연구 결과는 일반인들이 이해하기 힘든 내용이었다. 또한 대부분의 정보는 전문가 측면에서 이해할 수 있는 형태로 제공되며 대중 수용성 측면에 대한 고려는 배제되어 왔다.

따라서 본 연구에서는 일반인들의 방사선 인체 영향에 대한 이해도를 높이기 위하여 기호식품인 술, 담배, 커피 내 화학물질인 에탄올, 니코틴, 카페인에의 농도에 따라 동일한 생물학적 영향을 나타내는 방사선량을 제시하고 방사선량과 이들 화학물질의 농도 간의

상관관계를 도출하였다. Mouse Endothelial Cells 의 생존율(Surviving fraction)을 기준으로, 1Gy 방사선과 동일한 세포독성을 발생시키는 에탄올의 농도는 169.2mM, 니코틴의 농도는 5.9mM, 카페인 농도는 4.3mM 이었다. 이를 성인 60kg 의 남성을 기준으로 소주 1 병 섭취 시 혈중 알코올 농도는 약 30mM, 담배 1 개 피 당 혈중 니코틴 농도는 약 $1.6 \times 10^{-4}mM$, 아메리카노 한 잔 섭취 시 혈중 카페인 농도는 약 0.107mM 임을 고려하여 섭취량을 계산하면, 1Gy 방사선 피폭은 각각 일시에 소주 약 5.6 병, 담배 약 36,875 개 피, 아메리카노 40 잔을 섭취하는 것과 대등한 수준인 것을 확인할 수 있었다.

따라서 본 연구는 방사선 피폭에 대한 대중적 이해를 위해 방사선의 생물학적 영향에 대한 정량적 비교 정보를 제공하였다. 술, 담배, 커피는 일반인들이 위해성을 감수하며 선택하는 기호식품으로 위해성을 알면서도 자발적으로 선택하는 것이다. 그러나 방사선 피폭은 피동적인 피해이기 때문에 기호식품 섭취로 인한 피해보다 더 위험하게 여겨진다. 따라서 방사선 피폭 장해를 기호식품의 섭취로 인한 피해와 비교하여 설명함으로써 일반인들의 효과적인 이해를 증진시킬 수 있을 것이다.

마지막으로 본 연구에서는 실험 재인 혈관세포와 장기세포를 각각 한 종류의 세포를 사용하여 결과값을 구하였으므로 추가 실험 세포를 사용하여 방사선량과 화학물질의 농도 간의 상관관계를 도출해내는 연구가 추후 진행되어야 한다.

참 고 문 헌

- [1] B. J. Park, Analysis of Public Perception on Radiation: with One Year after Fukushima Nuclear Accident, J. Radiation Protection, Vol.37, No. 1, 2012.
- [2] Hong Tae Kim, Nuclear safety, KIC News, Vol.10, No. 1, pp. 15-26, 2007.
- [3] Eric J. Hall, D.PHIL., D.Sc., F.A.C.R., "Radiobiology for the Radiologist", Lippincott Williams & Wilkins, pp. 8-10, 1994.
- [4] Boice JD Jr, Blettner M, Kleinerman RA, Stovall M, Moloney WC, Engholm G, Austin DF, Bosch A, Cookfair DL, Krementz ET, Radiation dose and leukemia risk in patients treated for cancer of the cervix, Journal of the National Cancer Institute, Vol.79, No.6, pp.1295-1311, 1987.
- [5] Myron Pollycove, Nonlinearity of Radiation Health Effects, Environmental Health Perspectives, Vol.106, pp.363-368, 1998.
- [6] Albert Y. Sun, Magnus Ingelman-Sundberg, Etienne Neve, H. Matsumoto, Y. Nishitani, Y. Minowa, Y. Fukui, Shannon M. Bailey, Vinood B. Patel, Carol C. Cunningham, Tomas Zima, Lenka Fialova, Ludmila Mikulikova, Ptr Popov, Ivan Malbohan, Marta Janebova, Karel Nespor, and Grace Y. Sun, Ethanol and Oxidative Stress, Alcohol Clin Exp Res, Vol 25, No 5, pp. 237-243, 2001.

- [7]Christian Ginzkey et al, Analysis of nicotine-induced DNA damage in cells of the human respiratory tract, *Toxicology Letters*, Vol.208, pp. 23-29. 2012.
- [8]Astrid Nehlig, Gerard Debry, Potential genotoxic, mutagenic and anti-mutagenic effects of coffee: A review, *Mutation Research*, Vol.317, pp. 145-162, 1994.
- [9] BE Lehnert, R Iyer, Exposure to low-level chemicals and ionizing radiation : reactive oxygen species and cellular pathways, *Human & Experimental Toxicology*, Vol.21, pp. 65-69, 2002.
- [10] W ZHAO, D I DIZ, M E ROBBINS, Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury, *The British Journal of Radiation*, Vol.80, pp.23-31, 2007.
- [11] Albert Y. Sun, Grace Y. Sun, Ethanol and oxidative mechanisms in the brain, *J Biomed Sci*, Vol.8, pp. 37-43, 2001.
- [12] P. J. Brooks, DNA Damage, DNA Repair, and Alcohol Toxicity-A Review, *Alcohol Clin Exp Res*, Vol.21, No.6, pp. 1073-1082, 1007.
- [13] David H. Phillips, Alan Hewer, Carl N. Martin, R. Colin Garner, Maureen M. King, Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking, *nature*, Vol. 336, pp. 22-29, 1988.

- [14] Janet T Powell, Vascular damage from smoking: disease mechanisms at the arterial wall, *Vascular Medicine*, Vol.3, pp. 21-28, 1998.
- [15] Dan Qiao, FJ Seidler, TA Slotkin, Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 206, pp. 17-26, 2005.
- [16] NR Asadullina, SV Gudkov, VI Bruskov, Caffeine Modifies Effects of X-ray Action on Mice after Exposure to Radiation and Exhibits Radioprotective Properties, *Doklady Biochemistry and Biophysics*, Vol.442, pp. 22-25, 2012.
- [17] M. J. Fernandez, A. Lopez and A. Santa-Maria, Apoptosis Induced by Different Doses of Caffeine on Chinese Hamster Ovary Cells, *J. Appl. Toxicol*, Vol.23, pp.221-224, 2003.
- [18] Mahvash Jafari, Azra Rabbani, Dose and time dependent effects of caffeine on superoxide release, cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung, *Toxicology*, Vol.149, pp. 101-108, 2000.
- [19] Ann M. Bode, Zigang Dong, The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer, *Cancer letters*, Vol.247, pp.26-29, 2007.

- [20] Steller H, Mechanisms and genes of cellular suicide, Science, Vol.267, pp.1445-1449,1995.
- [21] J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie and A. R. Currie, Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics, Br. J. Cancer, Vol.26, pp. 239-257,1972.
- [22] Ingrid Herr and Klaus-Michael Debatin, Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy, Blood, Vol.98, No.9, pp. 2603-2614, 2001.
- [23] Hendry JH, Potten CS, Chadwich C, Cell death(apoptosis) in the mouse small intestine after low doses : effects of dose-rate, 14.7MeV neutrons, and 600MeV (maximum energy) neutrons. International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine, Vol.42, pp.611-620, 1982.
- [24] Hendry, J. H., Potten, C. S. and Merritt, A, Apoptosis induced by high- and low-LET radiations, Radiat. Environ. Biophys, Vol. 34, pp.59-62, 1995.
- [25] Mahvash Jafari, Azra Rabbani, Dose and time dependent effects of caffeine on superoxide release, cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung, Toxicology, Vol.149, pp. 101-108, 2000.

- [26] G Koopman, CP Reutelingsperger, GA Kuijten, RM Keehnen, ST Pals, and MH van Oers, Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis, *Blood*, Vol.84, pp.1415–1420, 1994.
- [27]Edward L. Alpen, “Radiation biophysics”, Academic press, pp. 375–377, 1998.
- [28]Kagawa K, Murakami M, Hishikawa Y, Abe M, Akagi T, Yanou T, Kagiya G, Furusawa Y, Ando K, Nojima K, Aoki M, Kanai T. Preclinical biological assessment of proton and carbon ion beams at Hyogo Ion Beam Medical Center, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, Vol.54, pp. 928–938, 2002.
- [29]Heinrich Noertel, Jens-Christoph Georgi, Luitpold Distel, Wolfgang Eyrich, Miriam Fritsch, Gerhard Grabenbauer, Rolf Sauer, Effects of low energy protons on clonogenic survival, DSB repair and cell cycle in human glioblastoma cells and B14 fibroblasts, *Radiotherapy and Oncology*, Vol.74, pp.115–118, 2004.
- [30] Yuka ISHIDA, Yasushi OHMACHI, Yukiko NAKATA, Takeshi HIRAOKA, Tsuyoshi HAMANO, Shinji FUSHIKI and Toshiaki OGIU, Dose-Response and Large Relative Biological Effectiveness of Fast Neutrons with Regard to Mouse Fetal Cerebral Neuron Apoptosis, *J. Radiat. Res*, Vol.47, pp.41–47, 2006.

[31] J. S. Kim, M. Yang, J. Kim, D. Lee, J. C. Kim, T. Shin, S. H. Kim and C. Moon, Comparison of the Dose-Response Relationship of Radiation-induced Apoptosis in the Hippocampal Dentate Gyrus and Intestinal Crypt of Adult Mice, Vol.148, No.4, pp. 492-497, 2012.

Abstract

A study on radiation–equivalency of chemical extracts from favorite foods in terms of cytotoxicity on mouse endothelial cell and normal diencephalon cell.

Seunghee Lee
Department of Nuclear Engineering
The Graduate School
Seoul National University

Biological effects of radiation have been studied depending on the radiation dose, quality, and exposure organs. Although the information about the radiation damage has been continuously informed to the public, there is still misunderstanding. Incorrect understanding might create the overestimated fear and anxiety to

the radiation effect. Thus, we propose a new informational form which can be easily understandable to the public.

The concentration of chemical components, such as ethanol, nicotine, and caffeine in the favorite foods, showing the radiation–equivalency, was investigated. This quantitative comparison has been proven by the in vitro cell experiment which shows that the mechanism of cell damage by the ethanol, nicotine, and caffeine is similar to that of the radiation. Mouse endothelial cell and normal diencephalon cell were used in this study for analyzing the cytotoxicity which was conducted by apoptosis assay and clonogenic assay.

Through this in vitro experiments, we found the concentration of chemical components which is corresponding to the 1Gy radiation exposure for cytotoxicity, resulting from the relationship between the radiation exposure dose and the concentration of chemical components. The study may provide an effective and easy way for understanding the radiation damage through the comparison with the amount of the favorite food intake.

Keywords: favorite foods, cytotoxicity, radiation damage,
radiation–equivalency

Student Number : 2011–23424